

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 8 月 18 日 (18.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/075002 A1

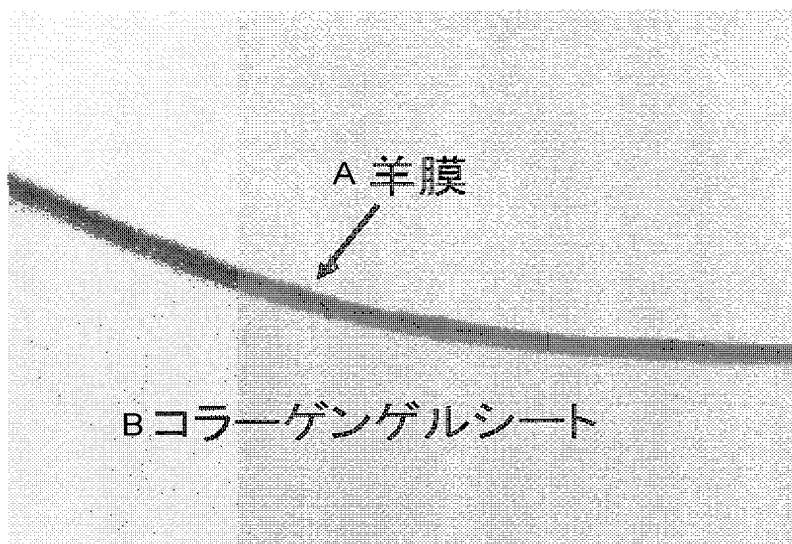
- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61L 27/44, 27/38  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001410  
 (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 1 日 (01.02.2005)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (30) 優先権データ:  
 特願2004-028581 2004 年 2 月 4 日 (04.02.2004) JP  
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人物質・材料研究機構 (NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 Ibaraki (JP). 株式会社バイオリンクインク (BIO LINK, INCORPORATED) [JP/JP]; 〒1060032 東京都港区六本木 1-7-2 7 全特ビル East 5 階 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田口 哲志 (TAGUCHI, Tetsushi) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 小林 尚俊 (KOBAYASHI, Hisatoshi) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 田中 順三 (TANAKA, Junzo) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 坪田 一男 (TSUBOTA, Kazuo) [JP/JP]; 〒2720824 千葉県市川市菅野 5-1 1-1 3 東京歯科大学市川総合病院内 Chiba (JP). 篠崎 尚史 (SHINOZAKI, Naoshi) [JP/JP]; 〒2720824 千葉県市川市菅野 5-1 1-1 3 東京歯科大学市川総合病院内 Chiba (JP). 榛村 重人 (SHIMMURA, Shigeto) [JP/JP]; 〒2720824 千葉県市川市菅野 5-1 1-1 3 東京歯科大学市川総合病院内 Chiba (JP). 宮下 英之 (MIYASHITA, Hideyuki) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: MEDICAL MATERIAL AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 医療用材料及びその製造方法



A... AMNION

B... COLLAGEN GEL SHEET

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a medical material enabling the achievement of improved therapeutic effects in epithelial cells such as keratoconjunctival epithelial cells with the use of amnion, and a process for producing the same. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] A medical material comprising amnion which is a placental tissue, a polymer film bonded to one surface of the amnion and crosslinked, and cells adhered to the other surface of the amnion. A process for producing the medical material as described above which comprises the step of preparing amnion from which the spongy layer has been removed, the step of bonding a biocompatible polymer film to one surface of the amnion followed by crosslinking, the step of adhering epithelial stem cells to the other surface of the amnion, and the step of proliferating epithelial cells from the epithelial stem cells on the amnion surface.

(57) 要約: 【課題】羊膜を用いる角結

膜上皮細胞などの上皮細胞において、より高い治療成果が計られる医療用材料及びその製造方法を提供すること。  
 【解決手段】胎盤組織である羊膜と、前記羊膜の一方の表面に張り合わせて架橋結合処理されている高分子膜と、前記羊膜の他方の表面に付着した細胞とを含む医療用材料。スポンジ層を取り除かれた羊膜を調製するステップと前記羊膜の一方の表面に生体適合性高分子膜を貼り合わせて架橋結合処理するステップと前記羊膜の他方の表面に上皮幹細胞を付着させるステップと前記羊膜表面に前記上皮幹細胞から上皮細胞を増殖させるステップとを含む前記医療用材料の製造方法。

WO 2005/075002 A1



〒2720824 千葉県市川市菅野 5-1 1-1 3 東京歯科大学市川総合病院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 西 義之 (NISHI, Yoshiyuki); 〒2350036 神奈川県横浜市磯子区中原 4-2 6-3 2-2 1 1 西特許事務所 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### 医療用材料及びその製造方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、医療用材料及びその製造方法に関し、より具体的には、生体適合性高分子膜を張り合わせて架橋結合処理した羊膜を用いた医療用材料及びその製造方法に関する。

#### 背景技術

- [0002] 角膜は、眼球を構成する光学系の最も外側にあり、血管を含まない透明な組織である。角膜と涙液が平滑な眼球表面を形成することにより、良好な視力を得ることができる。また、角結膜上皮細胞は常に外界と接し、外界の微生物などの異物、紫外線などの光線から眼球を守る防御作用を持っている。すなわち、角結膜上皮細胞は、角膜の透明性を維持し、眼球全体を防御して恒常性(homeostasis)を維持するために極めて重要な役割を果たしている。
- [0003] 角膜炎、角膜潰瘍、穿孔等の病態により角膜が濁り、透明性が失われてしまうと、視力が永続的に低下する。このような角膜の濁りにより生じた視力低下に対する治療法として、角膜移植が行なわれている。角膜移植は、透明性が失われた患者の角膜を取り除き、新たに透明な角膜を移植する。このような移植を行なうことによって、角膜の透明性が回復し、再び視力を取り戻すことができる。
- [0004] 角膜は、表面から上皮(厚さ約 $50\mu\text{m}$ )、ボーマン膜(約 $10\mu\text{m}$ )、角膜実質層(約 $500\mu\text{m}$ )、デスメ膜(約 $10\mu\text{m}$ )、内皮層(約 $5\mu\text{m}$ )の5層で構成され、合わせて $0.5\text{mm}$ の厚さであり、角膜実質層が90%の厚さを占める。移植される角膜は、透明であると同時に約 $0.5\text{mm}$ の厚みがなければならない。角膜厚が不均一な角膜は、強度的にも弱く、不整乱視の原因となるため良好な視力は得られない。角膜上皮は、角膜表面を覆うことにより細菌の侵入を防ぐとともに、光学的に平滑な面を維持する働きがある。こうした移植に適する角膜は、ドナー由来の角膜しか存在しない。
- [0005] ドナー不足により角膜の提供がない場合、角膜実質を含む移植を必要とする患者は治療できない。角膜実質の代わりに、単に高分子膜を移植するだけでは、移植さ

れた膜は脱落し、長期に維持できない。高分子膜を移植する場合には、上皮が生着しないため、上皮がない状態で維持しなければならない。しかし、上皮がない状況では細菌の侵入に対して防御することはできず、感染の原因となりうる。角膜上皮のみを移植する方法の一つとして、羊膜を用いた移植法が開発されている(非特許文献1、2)。

[0006] この移植法に用いられる羊膜は、帝王切開した妊婦等の胎盤から得ることができる。また、この羊膜は、厚い基底膜をもつことから、角結膜上皮細胞が、増殖、分化するための基質として作用する。さらに、羊膜は、免疫原性がほとんどなく、抗炎症作用、瘢痕形成抑制作用などを併せ持つため、羊膜上に移植される角結膜上皮やこれらの幹細胞組織は、移植受容者(レシピエント)の拒絶反応等から保護される。

[0007] 羊膜を用いた移植法では、まず、角膜化した眼瘢痕(scar)組織を除去し、角膜及び強膜を露出させる。露出された角膜及び強膜に、眼表面再建のため、羊膜が貼り付けられる。提供された角膜組織からは、中央部角膜(上皮、実皮、内皮を含む)が切り出され、角膜輪部組織の周囲が整えられて、露出された羊膜及び角膜実質上に移植、逢着される。このように移植された角膜輪部は、免疫原性のない羊膜に保護された状態で、羊膜を基質として分化、増殖し、羊膜上で角膜上皮が再生される。

[0008] 羊膜を用いた眼表面再建方法の改良法の一つとして、予め羊膜上に上皮幹細胞を付着させてインビトロ(in vitro)で培養し、上皮細胞が羊膜表面を覆うように幹細胞から上皮細胞を増殖させる方法がある(特許文献1〜5を参照)。

[0009] 非特許文献1:メディカル朝日1999年9月号:p62〜65

非特許文献2:Kazuo Tsubota et al.N Engl J Med 340:1697から1703、1999

特許文献1:特開2001-161353号公報

特許文献2:特開2002-320666号公報

特許文献3:特開2002-331025号公報

特許文献4:特開2003-126236号公報

特許文献5:特表2003-532466号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 上記の各文献に開示されている羊膜を用いた眼表面再建方法では、移植は、上皮幹細胞及び該上皮幹細胞から増殖した上皮細胞が上に付着した羊膜ごと行なう。

[0011] しかし、羊膜を基質として用いた移植片は100ミクロンに満たない厚みしかない上、角膜実質に相当する層がないために強度的に脆弱である。眼表面の再構築に適していても、角膜実質を含む、厚みを必要とした移植には適さない。角膜実質にまで病変が及ぶ症例には、羊膜を用いた移植方法に更なる改良が必要である。

[0012] 本発明の目的は、羊膜を用いる角結膜上皮細胞などの上皮細胞において、より高い治療成果が計られる医療用材料及びその製造方法を提供することである。

#### 課題を解決するための手段

[0013] 上記目的達成のため、本発明者らは、生体適合性高分子膜と張り合わされ架橋された羊膜表面において、上皮幹細胞を培養すれば、生体適合性高分子膜、羊膜、上皮幹細胞及びその細胞から羊膜を覆うように増殖して一層になった上皮細胞を含む医療用材料が得られることを見出した。

[0014] すなわち、本発明は、胎盤組織である羊膜と、前記羊膜の一方の表面に張り合わせて架橋結合処理されている高分子膜と、前記羊膜の他方の表面に付着した細胞とを含む医療用材料、である。

[0015] また、本発明は、スポンジ層を取り除かれた羊膜を調製するステップと前記羊膜の一方の表面に生体適合性高分子膜を貼り合わせて架橋結合処理するステップと前記羊膜の他方の表面に上皮幹細胞を付着させるステップと前記羊膜表面に前記上皮幹細胞から上皮細胞を増殖させるステップとを含む上記の医療用材料の製造方法、である。

#### 発明の効果

[0016] 生体適合性高分子膜は生体親和性が高いため、生体適合性高分子膜を用いない場合に比べて、移植片を移植した後、生着率が高まる。また、生体適合性高分子膜は透明で厚みを適宜変えることができるため、角膜上皮又は結膜上皮と角膜実質の移植に特に有効である。

[0017] また、生体適合性高分子膜と予め架橋結合処理された羊膜上で上皮幹細胞を培養することにより、ハンドリングが向上し、縫合が容易になるという利点が生じる。角膜

上皮と角膜内皮を両面に生着させることにより、人工角膜として応用できる。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0018] 羊膜は、脊椎動物の有羊膜類(Amniota:爬虫類、鳥類、哺乳類)の発生過程において形成される胚膜のうち、最内側にあって胚を直接覆う膜である。羊膜は、厚い基底膜を有し、細胞表面に組織適合性抗原を発現していないため、免疫原性がほとんどなく、抗炎症作用等を有するため、移植に適した材料である。このように羊膜は、免疫原性がほとんどないが、移植後の免疫反応の惹起をより確実に防止するため並びに種間感染を防ぐために、本発明の医療用材料を移植される動物種と同一の動物に由来する羊膜を使用するのが望ましい。すなわち、ヒトに移植するための医療用材料を製造するためには、ヒトの羊膜を使用するのが望ましい。また、移植片を移植される動物と同一動物種に由来する羊膜を用いる限り、親、子供など血縁関係にあるものに限定されず、他人のものを使用することができる。
- [0019] ヒト由来の羊膜は、帝王切開した妊婦から得ることができる。帝王切開した妊婦からのものでないと一般に汚染の可能性があるので使用しにくい。羊膜は、一般に、下層側から、スポンジ層(海綿層)、緻密層(compact layer)、基底膜層、上皮層を有するが、本発明の医療用材料に用いるための羊膜は、スポンジ層と上皮層は予め除去処理されているものを用いることが望ましい。以下の明細書では、特に示さない限り、「羊膜」とは、スポンジ層と上皮層を除去された羊膜を意味する。
- [0020] スポンジ層と上皮層を除去された羊膜は、生体適合性高分子膜と張り合わされて架橋結合処理されている。本発明で利用できる生体適合性高分子膜は、生体高分子、合成高分子及びこれらのハイブリッドであってもよい。生体高分子としては、タンパク質、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、アルギン酸、キトサン、ポリアミノ酸、又はこれらの2つ又はそれ以上の組み合わせが挙げられる。グリコサミノグリカンには、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、又はこれらの誘導体が挙げられる。また、タンパク質としては、コラーゲン、アテロコラーゲン、アルカリ処理コラーゲン、ゼラチン、ケラチン、血清アルブミン、卵白アルブミン、ヘモグロビン、カゼイン及びグロブリン、フィブリノーゲン、又はこれらの誘導体が挙げられる。

- [0021] 生体適合性高分子膜に用いる合成高分子としては、水溶性モノマーの重合体又は水溶性高分子が挙げられる。水溶性モノマーとしては、*n*-イソプロピルアクリルアミド、アクリルアミド、アクリル酸、メタクリル酸、ビニルピロリドン又はこれらの2つ又はそれ以上の組み合わせが挙げられる。また、水溶性高分子としては、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、脂肪族及び芳香族ジイソシアナート、CNBrによりアミノ基を導入したPVA、の1つ又はこれらの2つ又はそれ以上の組み合わせが挙げられる。
- [0022] これらのうちで、入手が容易であること及び角膜等への親和性の高さから、コラーゲンを用いるのが好ましい。コラーゲンの膜は、アルカリ処理I型コラーゲンの架橋体が好ましく、このような膜は、例えば、新田ゼラチン株式会社(NITTA GELATIN Inc.)から入手できるブタ皮膚由来アルカリ処理I型コラーゲンなどを用いることができる。コラーゲンには、十数種類のタイプがあるが、これらのタイプ及び由来にはよらない。
- [0023] 羊膜と生体適合性高分子膜との架橋結合の様式としては、共有結合による固定化がある。これは、グルタルアルデヒドやホルムアルデヒドなどの架橋剤とコラーゲンやゼラチンの存在下で架橋処理を行うことにより実施することができる。この処理は、具体的には次のようなステップにより行うことができる。
- [0024] まず、羊膜をガラス板上に広げ、そこに架橋剤とコラーゲンの混合溶液を塗布する。その後、生体適合性高分子膜を載せることにより羊膜と生体適合性高分子膜との間で架橋反応が起こり、羊膜を固定することができる。さらに、代替的に架橋剤のみを羊膜に塗布し、生体適合性高分子膜と反応させても架橋結合の処理を行うことができる。このような架橋結合は、共有結合による架橋であるため、生理的環境下でも羊膜と生体適合性膜が引き剥がれることが無く、安定に存在するという特徴を有する。
- [0025] 上記生体適合性高分子膜と架橋した羊膜の上に付着させる上皮幹細胞は、細胞分裂して上皮組織細胞を生じる能力があるものである。本発明において用いられる上皮細胞としては、角膜上皮細胞及び結膜上皮細胞などが含まれる。細胞分裂して角膜上皮を生じる角膜上皮細胞の幹細胞は、角膜輪部に存在する。また、細胞分裂して結膜上皮を生じる結膜上皮細胞の幹細胞は、結膜円蓋部等に存在する。これら

の細胞は、その細胞が存在する部位の組織を切り出すことにより、生体から取り出すことができる。

[0026] 取り出した細胞は、切り出した組織を羊膜の上に直接置く、あるいは切り出した組織をトリプシンやディスパーゼなどの酵素で処理することで細胞のみを取り出し、その細胞を羊膜の上に播く、などの方法で羊膜の上に付着させることができる。羊膜の上に付着した細胞は、例えば、フィーダーレイヤー(feeder layer)細胞の存在下でDMEM/F12液体培地に15容積%の血清とコレラトキシン、上皮増殖因子、インシュリン、ジメチルスルフォキシドを添加した培地などを用いることで、羊膜の上で増殖させることができる。生体の角膜と同じように重層化した上皮細胞は、羊膜の上をくまなく覆うまで増殖させた細胞を、引き続いて培地の液量を細胞が空気に晒されるまで減らして培養する事で得ることができる。

[0027] 以下、角膜輪部を上皮幹細胞組織として用いた場合を説明するが、結膜円縁部等を上皮幹細胞として用いた場合も同様であり、あるいは、角膜内皮細胞も同様に本発明の医療用材料として使用することができる。

[0028] 上皮幹細胞を含む角膜輪部又は結膜円縁部のような上皮幹細胞組織は、実質的に幹細胞のみからなるものであっても、幹細胞以外に上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を含んでいるものであってもよい。上皮幹細胞組織は、移植を受ける患者(レシピエント)の血縁者から得られたものであっても、レシピエントとは血縁関係の全くない他人から得られたものであってもよい。レシピエント以外から上皮幹細胞を得る場合には、免疫による拒絶反応が生じる惧れを回避するために、HLAタイプの適合した提供者に由来するものが好ましい。しかし、HLAタイプが適合した提供者に由来する上皮幹細胞が得られない場合には、HALタイプが適合していない提供者に由来する上皮幹細胞を用いてもよい。移植による感染等を防止するために、提供された組織は、予め感染などの惧れがないことを確認されているものを用いるのが望ましい。上皮幹細胞は、幹細胞を含んでいると判断される限り、移植を受ける患者(レシピエント)自身から得られたものを用いることができる。

[0029] さらに、上皮幹細胞組織は、状態がよく、上皮細胞を増殖し得るものが好ましい。また、提供者又はレシピエント本人から切り出される幹細胞組織の大きさは、例えば、



幹細胞組織の状態がよい場合には、2cm平方の大きさの羊膜に対して1mm平方程度でもよい。切り出される幹細胞組織の大きさは、細胞の状態、レシピエントの疾患の程度等に応じて適宜変更可能である。

[0030] 提供者から切り出された上皮幹細胞組織は、生体適合性高分子膜と架橋結合処理した羊膜の上に付着させる。上皮幹細胞組織を羊膜上に付着させるときには、本発明の医療用材料を移植した際に、上皮幹細胞組織が生体内で本来配置しているような位置に付着させるのが望ましい。例えば、上皮幹細胞組織が、角膜輪部である場合には、レシピエントの角膜の大きさ程度に成型し、環状に近い形状で配置するのが望ましい。

[0031] 生体適合性高分子膜と張り合わされて架橋結合処理された羊膜上に置かれた上皮幹細胞は、インビトロで羊膜と幹細胞が培養液に浸かるようにした後、幹細胞が空気に晒される状態にすることにより上皮を重層化させることができる。この上皮細胞は、上皮幹細胞組織に含まれる幹細胞が細胞分裂して増殖したものを含むが、それ以外に提供された上皮幹細胞組織に含まれる幹細胞以外の上皮細胞が細胞分裂することにより生じたものを含んでもよい。最終的には、羊膜表面を覆うように(上皮)幹細胞から上皮細胞を羊膜上で増殖分化させ、好ましくは上皮細胞の重層化を促す。また、増殖をインビトロで行なうことなく、上皮幹細胞組織を羊膜上に付着させた状態でレシピエントに移植して、上皮細胞の増殖をレシピエントの患部にて行っても良い。

[0032] また、羊膜上で増殖させた上皮細胞は、移植の際に状態のよいものであることが望ましく、例えば、対数増殖期(logarithmic growth phase)にある細胞であり、代謝活性が定常的に維持され、一定の細胞周期(cell cycle)で分裂を繰り返している状態の細胞が好ましい。

[0033] このように、羊膜と、前記羊膜に架橋結合処理されている生体適合性高分子膜と、前記生体適合性高分子膜と貼り合わされていない側の前記羊膜表面に付着された上皮幹細胞組織と、前記幹細胞組織から増殖させた上皮細胞とを含む医療用材料は、上皮細胞とともにその幹細胞組織まで根絶又は損傷した患部に移植される。

## 実施例 1

[0034] 1. 生体適合性膜の調製

### 1) 生体高分子ゲル(コラーゲンゲルシート)

コラーゲンのジメチルスルフォキシド(DMSO)溶液(30重量%)にグルタルアルデヒドが最終濃度6mMになるように添加し、その混合溶液を厚さ500  $\mu$ mのシリコンゴムをスペーサーとする2枚のガラス板間に流し込み、37°Cで24時間反応を行い、コラーゲンゲルシートを得た。その後、ゲルシートを大過剰のリン酸緩衝液に浸漬することにより、DMSOを置換した。

### 2) 合成高分子ゲル(PVAゲルシート)

PVA(平均重合度77,000)の水/DMSO混合溶媒溶液(15容積%)をオートクレーブにて120°C、5時間かけて溶解した。その溶液を厚さ200～500  $\mu$ mのシリコンゴムをスペーサーとする2枚のガラス板間に流し込み、-20°Cの冷凍庫で2時間放置後、室温で解凍し、PVAゲルシートを得た。その後、凍結乾燥したPVAゲルシートをスズ触媒含有ヘキサメチレンジイソシアナートの10重量%トルエン溶液に入れ、窒素バブリング下、室温で1時間攪拌することによりPVAゲルシート表面にイソシアナート基を導入した。そのゲルシートを大過剰のリン酸緩衝液に浸漬することにより、イソシアナート基のアミノ基への変換を行った。

### 2. 生体適合性高分子膜への羊膜の化学的固定化

コラーゲンのDMSO溶液(30重量%)に架橋剤としてグルタルアルデヒドが最終濃度200mMになるように添加し、その混合溶液を羊膜上に滴下した。その後、コラーゲンゲルの混合溶液を塗布し、上記1.で調製したコラーゲンゲルシートあるいはPVAゲルシートをその上に置いた。固定化の反応は、37°C、24時間で行った。図1の断面光学顕微鏡写真(ヘマトキシリン(Hematoxylin)–エオジン(Eosin)(HE)染色)に示されるとおり、羊膜固定化コラーゲンゲルが得られた。

### 3. 生体適合性高分子膜に固定した羊膜への上皮細胞層の形成

フィーダーレイヤー細胞として、マイトマイシンCで処理した3T3細胞をトランスウェル(transwell)の下ウェルに播種した。その後、海外ドナー提供の移植用ヒト角膜より切り出した輪部を37°Cの0.05重量%トリプシンEDTAで1時間処理する事により、幹細胞を含む上皮細胞を分離した。トランスウェルの上のウェルに上記2.の工程で得られた羊膜固定化コラーゲンゲルシート及び羊膜固定化PVAゲルシートをそれぞれ

羊膜が上になるように置き、その上に上皮細胞を播種して羊膜表面を細胞が完全に表面を覆うまで培養した。上皮層の重層化は、培地の液量を上皮細胞の表面が空気に晒されるまで減らして2週間培養することによって行った。

- [0035] 図2に、羊膜固定化コラーゲンゲルシート上に、角膜上皮細胞を重層培養した断面の光学顕微鏡写真(HE染色)を示す。また、図3に、羊膜固定化PVAゲルシート上に、角膜上皮細胞を重層培養した断面の光学顕微鏡写真(HE染色)を示す。厚みが約50ミクロンの均一な角膜上皮層が形成されたことが分る。

#### 図面の簡単な説明

- [0036] [図1]実施例1の羊膜固定化コラーゲンゲル断面を示す図面代用の光学顕微鏡写真(ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色)である。

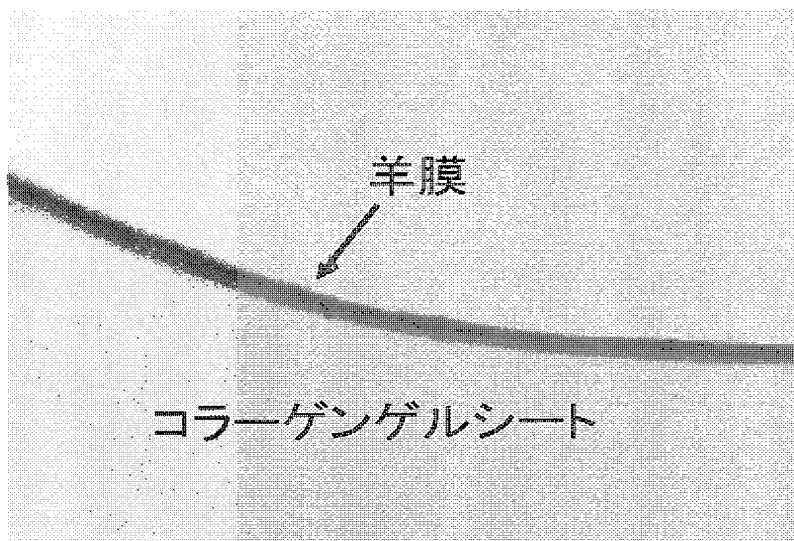
[図2]実施例1の方法により羊膜固定化コラーゲンゲルシート上に、角膜上皮細胞を重層培養した断面を示す図面代用の光学顕微鏡写真(HE染色)である。

[図3]実施例1の方法により羊膜固定化PVAゲルシート上に、角膜上皮細胞を重層培養した断面を示す図面代用の光学顕微鏡写真(HE染色)である。

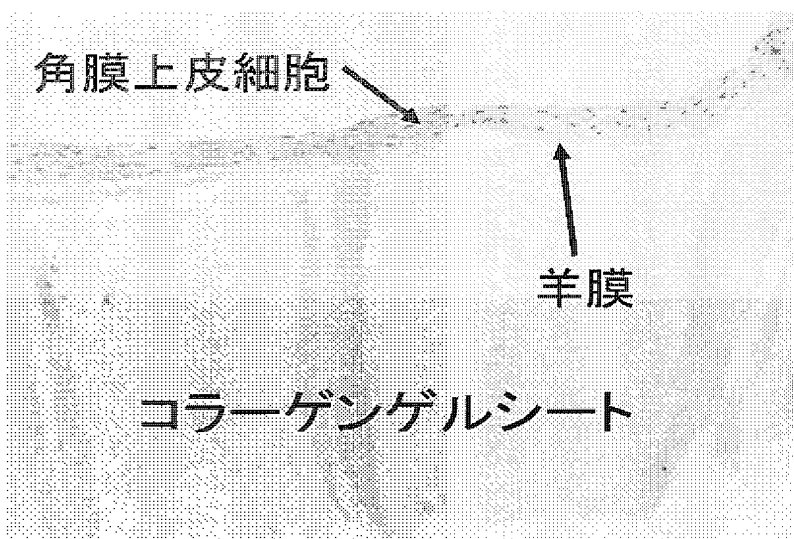
### 請求の範囲

- [1] 胎盤組織である羊膜と、前記羊膜の一方の表面に張り合わせて架橋結合処理されている高分子膜と、前記羊膜の他方の表面に付着した細胞とを含む医療用材料。
- [2] 請求項1記載の細胞が、幹細胞から羊膜上で増殖分化して重層化した上皮細胞であることを特徴とする請求項1に記載の医療用材料。
- [3] 請求項1記載の細胞が、角膜上皮細胞、角膜実質細胞、角膜内皮細胞又は結膜上皮細胞であることを特徴とする請求項1又は2に記載の医療用材料。
- [4] 請求項1記載の高分子膜が、生体高分子、合成高分子又はこれらの2つ又はそれ以上の組み合わせからなるゲルであることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の医療用材料。
- [5] スポンジ層を取り除かれた羊膜を調製するステップと前記羊膜の一方の表面に生体適合性高分子膜を貼り合わせて架橋結合処理するステップと前記羊膜の他方の表面に上皮幹細胞を付着させるステップと前記羊膜表面に前記上皮幹細胞から上皮細胞を増殖させるステップとを含む請求項1記載の医療用材料の製造方法。

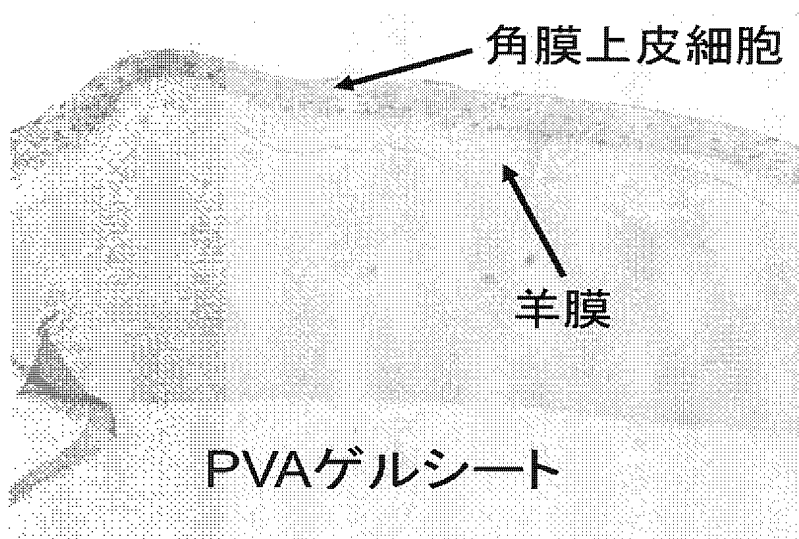
[図1]



[図2]



[図3]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001410

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/44, 27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/44, 27/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-161353 A (Yugen Kaisha Japan Ophthalmic Consultants), 19 June, 2001 (19.06.01), Claim 1 (Family: none)	1-5
Y	JP 09-122227 A (Bio-Engineering Laboratories, Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.97), Claim 1 & US 5618312 A & CA 2173546 C & EP 773032 A1 & CN 1149498 A	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

24 March, 2005 (24.03.05)

Date of mailing of the international search report

12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2005/001410

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-190192 A (Japan Science and Technology Corp.), 08 July, 2003 (08.07.03), Par. No. [0014] (Family: none)	1-5
Y	JP 08-266613 A (Toyobo Co., Ltd.), 15 October, 1996 (15.10.96), Par. No. [0042] & CA 2173508 A & CN 1142975 A & EP 734736 A1 & US 5723010 A & US 5876451 A	1-5



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1<sup>7</sup> A61L27/44, 27/38

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1<sup>7</sup> A61L27/44, 27/38

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-161353 A (有限会社ジャパン・オフサルミック・コンサル タンツ) 2001.06.19, 請求項1参照 (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 09-122227 A (株式会社バイオ・エンジニアリング・ラボラトリ ーズ) 1997.05.13, 請求項1参照 & US 5618312 A & CA 2173546 C & EP 773032 A1 & CN 1149498 A	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.03.2005

国際調査報告の発送日

12.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安川 聡

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-190192 A (科学技術振興事業団) 2003.07.08, 【0014】段落参照 (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 08-266613 A (東洋紡績株式会社) 1996.10.15, 【0042】段落参照 & CA 2173508 A & CN 1142975 A & EP 734736 A1 & US 5723010 A & US 5876451 A	1-5